

血管内皮におけるカベオリン-1/内皮型一酸化窒素合成酵素複合体のEDHを介した微小循環の恒常性維持における重要性

| | |
|--------|---|
| 著者 | 齊藤 大樹 |
| 号 | 85 |
| 学位授与機関 | Tohoku University |
| 学位授与番号 | 医博第3483号 |
| URL | http://hdl.handle.net/10097/00097120 |

| | |
|-------------|--|
| 氏 名 | さいとう ひろき 齊藤 大樹 |
| 学 位 の 種 類 | 博士 (医学) |
| 学位授与年月日 | 平成 28 年 3 月 25 日 |
| 学位授与の条件 | 学位規則第 4 条第 1 項 |
| 研 究 科 専 攻 | 東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻 |
| 学 位 論 文 題 目 | 血管内皮におけるカベオリン-1/内皮型一酸化窒素合成酵素複合体の EDH を介した微小循環の恒常性維持における重要性 |
| 論 文 審 査 委 員 | 主査 教授 下川 宏明 教授 進藤 千代彦 教授 中山 雅晴 |

論 文 内 容 要 旨

血管内皮細胞は内皮由来弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factor: EDRF) と総称される 3 つの弛緩因子、一酸化窒素 (nitric oxide: NO)、プロスタサイクリン (prostacyclin: PGI₂)、内皮由来過分極因子 (endothelium-dependent hyperpolarization factor: EDH factor) を産生、遊離して血管のトーンスを調整している。EDRFは血管径に応じて寄与度が大きく異なり、太い血管 (導管血管) では NO が主であるが、血管径が狭小化するに従って EDH の寄与が大きくなり、臓器灌流を規定する微小血管 (抵抗血管) では EDH が主な血管弛緩因子として働く。著者らの研究グループは、eNOS は太い血管では文字通り NO 産生に与っているが、微小血管では主に EDH の産生源となっており、血管径に応じた生物学的多様性を持つことを明らかにした。また、こうした血管径に応じた eNOS の生物学的多様性には、細胞膜に存在するカベオラの主要構成タンパク質であるカベオリン-1 (caveolin-1: Cav-1) が重要であることを最近の研究で報告した。しかしながら、カベオリンの多様な生理作用と幅広い分布から、内皮細胞のカベオリン-1 の微小循環における詳細な役割はいまだ明らかになっていない。そこで本研究では、新たに内皮特異的 Cav-1 欠損

(endothelium-specific Cav-1-knockout: eCav-1-KO) マウスを作成し、微小循環の恒常性維持における内皮細胞の Cav-1 の役割を検証した。

方法と結果: eCav-1-KO マウスは正常血圧であるにも関わらず、心肥大を呈していた。電子顕微鏡を用いた観察で、eCav-1-KO マウスでは内皮細胞でのみカベオラが消失していることが示された。免疫沈降法を用いた実験で、野生型マウスでは Cav-1/eNOS 複合体が形成されていたが、eCav-1-KO マウスでは複合体が消失していた。eCav-1-KO マウスの腸間膜動脈では、eNOS の活性化リン酸化部位である Ser1177 のリン酸化の程度は不変であったが、抑制的リン酸化部位である Thr495 のリン酸化が野生型マウスと比較して有意に減弱していた。これらの結果より eCav-1-KO マウスにおいて、eNOS が脱抑制状態にあることが示された。等尺性張力測定実験及び Langendorff 型灌流心モデルを用いた実験では、eCav-1-KO マウスは、内皮依存性弛緩反応において NO 依存性の反応が亢進していたが、一方で EDH 依存性の反応が減弱していた。過剰な NO 産生によってニトロ化環状ヌクレオチドである 3, 5-cyclic monophosphate (8-nitro-cGMP) が生成され、シグナル伝達物質として作用を発揮することが報告されている。免疫組織化学的検討で、8-nitro-cGMP の発現が eCav-1-KO マウスの心臓で強く発現していることが示された。8-nitro-cGMP によるタンパク質修飾の一つである S-グアニル化と呼ばれる反応に関する検討において、eCav-1-KO マウスの心臓における H-Ras は野生型と比較して有意に S-グアニル化修飾を受けていた。また、eCav-1-KO マウスの心臓では、H-Ras の下流シグナルである MAP キナーゼが活性化していた。

(書式12)

結論：Cav-1は抵抗血管においてeNOSと複合体を形成することでNOの産生を抑制し、EDH反応を惹起している。微小循環においてCav-1がeNOSからの過剰なNO産生を抑制し、EDH反応によって循環を維持することは、臓器レベルのニトロ化ストレスに対して保護的に作用し、微小循環の恒常性の維持に重要な役割を果たしていると考えられる。

審査結果の要旨

博士論文題目 血管内皮におけるカベオリン-1/内皮型一酸化窒素合成酵素複合体の EDH を介した微小循環の恒常性維持における重要性

所属専攻・分野名 医科学専攻 ・ 循環器内科学分野

学籍番号 B2MD5046 氏名 齊藤 大樹

血管内皮細胞は3つの弛緩因子、一酸化窒素（NO）、プロスタサイクリン、内皮由来過分極因子（endothelium-dependent hyperpolarization factor: EDH factor）を産生、遊離して血管のトーンスを維持している。NO と EDH は血管径に応じて寄与度が異なり、導管血管では NO が主であるが、臓器灌流を規定する抵抗血管では EDH が主な血管弛緩因子として働く。eNOS は太い血管では NO 産生に与っているが、微小血管では主に EDH の産生源となっており、血管径に応じた生物学的多様性を持つことが知られている。こうした eNOS の生物学的多様性には、カベオリン-1（Cav-1）が重要であることが最近の研究で明らかとなった。しかしながら、Cav-1 の幅広い分布から、内皮細胞の Cav-1 の詳細な役割はいまだ明らかになっていない。そこで本研究では、新たに内皮特異的 Cav-1 欠損（eCav-1-KO）マウスを作成し、微小循環における内皮細胞の Cav-1 の役割を検証した。eCav-1-KO マウスは正常血圧であるにも関わらず、心肥大を呈していた。eCav-1-KO マウスの腸間膜動脈では、eNOS の抑制的リン酸化部位である Thr495 のリン酸化が野生型マウスと比較して有意に減弱しており、eNOS が脱抑制状態にあることが示された。等尺性張力測定実験及び Langendorff 型灌流心実験では、eCav-1-KO マウスは NO 依存性の弛緩反応が亢進していたが、一方で EDH 依存性の弛緩反応が減弱していた。免疫組織化学的検討で、過剰な NO により産生されるニトロ化環状ヌクレオチドである 8-nitro-cGMP が eCav-1-KO マウスの心臓で強く発現していることが示された。8-nitro-cGMP によるタンパク質修飾の一つである S-グアニル化反応に関する検討において、eCav-1-KO マウスの心臓における H-Ras は野生型と比較して有意に S-グアニル化修飾を受けていた。本研究は、内皮の Cav-1 が欠損することで本来 EDH が主要な役割を果たすべき微小循環においても NO が主要な因子へ変化し、その結果、8-nitro-cGMP の産生を介したニトロ化ストレスが生じることを示した初めての論文であり、学位に十分値すると考えられる。よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。